

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.  
Vol. 15, 1977, pp. 367–369

## Eine schnelle teilautomatische Abtrennung der Katecholamine aus Urin

Von H. H. Bussemas, Chr. Lippmann und G. Schwedt

*Institut für Arbeitsphysiologie (Geschäftsführender Institutsleiter: Prof. Dr. H. G. Wenzel) an der Universität Dortmund*

(Eingegangen am 9. Dezember 1976)

**Zusammenfassung:** Die teilautomatische Abtrennung der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin beruht auf der Adsorption an Aluminiumoxid bei pH 8,4 und anschließender Desorption mit 0,05 mol/l Perchlorsäure im Batchverfahren. Die einzelnen Teilschritte wurden untersucht und optimiert. Die Vorteile des Verfahrens gegenüber der manuellen Säulentechnik sind verringerter Zeit- und Personalbedarf, verminderte Gefahr des Einschleppens von Störsubstanzen und exakte Einhaltung der zeitlichen Bedingungen.

Die Wiederfindung beträgt für Adrenalin  $87,3 \pm 4,1\%$  und für Noradrenalin  $71,9 \pm 5,9\%$ .

### *A rapid semiautomatic separation of urinary catecholamines*

**Summary:** The semiautomatic separation of the catecholamines, adrenaline and noradrenaline, is based on their adsorption onto aluminium oxide at pH 8.4, followed by batch elution with 0.05 mol/l perchloric acid. The separate steps of the operation were investigated and optimised. Advantages of the method, compared with the manual column technique, are decreased time of operation, less involvement of personnel, less danger of carry-over of interfering substances, and an exact standardisation of the processing time.

The recovery was  $87.3 \pm 4.1\%$  for adrenaline, and  $71.9 \pm 5.9\%$  for noradrenaline.

### Einführung

Von den möglichen Abtrennungungsverfahren für die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin aus Urin hat sich die Adsorption an Aluminiumoxid bewährt und in der Praxis durchgesetzt (1). Das von uns bisher angewendete Säulenverfahren (2) ist für hohe Probenzahlen zu arbeits- und zeitintensiv und läßt sich im Hinblick auf eine schnellere Durchführung nicht wesentlich verbessern; hingegen bietet die Abtrennung im Batch-Verfahren günstige Möglichkeiten für eine Teilautomatisierung.

12 Reagenzgläser im Ständer rotieren mit 60 U/min um ihre vertikale Achse  
10 ml-Reagenzgläser mit Ringmarke und NS 12,5 – Polyethylenstopfen  
Vibro-Fix (Janke & Kunkel KG, Staufen)  
Wasserstrahlpumpe  
Schüttelmäschine

### *Reagenzien und Lösungen*

Aluminiumoxid sauer (Woelm)  
Phosphat-Lösung: Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat p. A. (Merck) 5 g/l in Wasser, pH 8,4  
EDTA-Lösung: Titriplex III p. A. (Merck) 50 g/l in Wasser  
Natronlauge: Natriumhydroxid p. A. (Merck) 80 g/l in Wasser  
Perchlorsäure: Perchlorsäure 700 g/kg p. A. (Merck) 0,05 mol/l  
Phenolphthalein-Lösung: Phenolphthalein Indikator (Merck) 1 g/l in Ethanol

### Material und Methoden

#### *Untersuchungsmaterial*

Harn wird sofort nach Gewinnung mit 5 mol/l Schwefelsäure auf pH 1–2 angesäuert und kühl aufbewahrt: bis 1 Woche bei +4 °C, längere Zeit bei –20 °C.

#### *Geräte*

Multi-Dosimat-Titrierstand E 415 (Metrohm, Herisau)  
pH-Meter E 388 (Metrohm)  
Reagenzglas-Rotierer (Eigenbau in Anlehnung an Cordes (persönl. Mitt.):

#### *Durchführung*

Feine Anteile des Aluminiumoxids durch wiederholtes Suspensieren in bidest. Wasser (etwa 10 x) entfernen, im Trockenschrank etwa eine Woche bei 40 °C trocknen.

0,5 g  $\text{Al}_2\text{O}_3$  in Reagenzglas einwiegen  
+ 5 ml Urinprobe  
+ 2 ml EDTA-Lösung  
+ 0,1 ml Phenolphthalein-Lösung  
+ Natronlauge bis zur deutlichen Rotfärbung (pH 8,4) titrieren, dabei kräftig durchmischen (Vibro-Fix)  
+ Phosphat-Lösung bis zur Marke auffüllen

5 min rotieren lassen (Adsorption), überstehende Lösung ab-saugen  
 + etwa 5 ml Phosphatlösung  
 5 min rotieren lassen, überstehende Lösung absaugen  
 + etwa 5 ml bidest. Wasser  
 5 min rotieren lassen, überstehende Lösung absaugen  
 + 5,0 ml 0,05 mol/l Perchlorsäure  
 5 min rotieren lassen (Desorption).

Anstelle des Rotierers kann auch eine Schüttelmaschine benutzt werden.

Die fluorimetrische Bestimmung wurde mit einem automa-tischen Analysensystem (3) in Anlehnung an *Wisser* (4) nach der Trihydroxyindol-Methode vorgenommen.

Die einzelnen Teilschritte der Abtrennung wurden systematisch untersucht. Um die optimalen Bedingungen zu ermitteln, wurden für jede Veränderung fünfmal 5 ml angesäuerter Urin-probe eingesetzt (Ergebnisse siehe Tab. 1).

Tab. 1. Ergebnisse ( $\bar{x} \pm s$ ) aus den Optimierungsversuchen ( $n = 5$ ).

Bedingung	Adrenalin [nmol/l]	Noradrenalin [nmol/l]
Waschen mit heißer Säure, Trocknen bei 200 °C	98,3 $\pm$ 2,7	288,4 $\pm$ 12,4
Waschen mit Wasser, Trocknen bei 40 °C	101,5 $\pm$ 2,2	279,6 $\pm$ 1,8
pH-Wert-Einstellung mit Glaselektrode (Becherglas)	52,4 $\pm$ 5,5	287,2 $\pm$ 13,0
mit Indikator (Reagenzglas)	59,5 $\pm$ 12,6	277,2 $\pm$ 13,6
Adsorption		
ohne Kühlung	36,0 $\pm$ 4,9	87,5 $\pm$ 3,0
mit Kühlung	32,8 $\pm$ 3,3	101,1 $\pm$ 8,3
Wiederfindungsrate		
mit 0,2 mol/l Essigsäure	0,761 $\pm$ 0,060	0,660 $\pm$ 0,042
mit 0,05 mol/l HClO <sub>4</sub>	0,873 $\pm$ 0,041	0,719 $\pm$ 0,059

## Ergebnisse und Diskussion

### Vorbehandlung des Aluminiumoxids

Gebräuchlich ist das Waschen mit heißer Säure und Trocknen bei 200 °C. Das Waschen mit Wasser und Trocknen bei 40 °C (Tab. 1) reicht jedoch aus.

### Einstellen des pH-Wertes

Um Überführungsschritte möglichst zu vermeiden, sollte das Einstellen des pH-Wertes direkt im Reagenzglas vor-genommen werden. Die Verwendung einer normalen Glaselektrode wie beim Säulenverfahren ist dabei nicht möglich. Wie von *Merrills* (5) beschrieben, läßt sich zur Einstellung des pH-Wertes von 8,3–8,5 Phenolphthalein als Indikator einsetzen (Tab. 1).

### Adsorption

Als ausreichende Menge Aluminiumoxid wurde 0,5 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> für 5 ml Urin ermittelt (s. Abb. 1). Nach 5 min

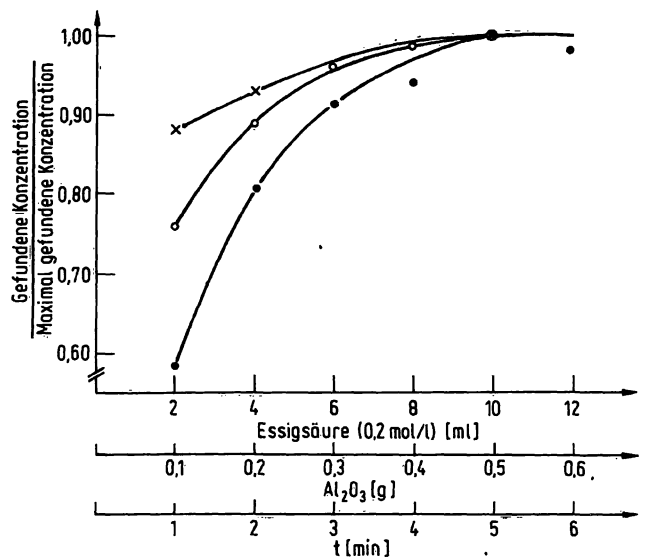


Abb. 1. Optimierung der Methode.

Gefundene relative Konzentration ( $\bar{x}$ ) von Adrenalin und Noradrenalin im Reaktionsansatz (5 ml Urin) in Abhängigkeit von der Aluminiumoxidmenge (•—•), der Adsorptionszeit (x—x) und vom Desorptionsvolumen (o—o).

ist die Adsorption abgeschlossen (s. Abb. 1). Kühlung nach l.c. (2) (siehe Tab. 1) und stabilisierende Zusätze wie Ascorbinsäure (5) oder Natriummetabisulfit (6) verbessern weder die Wiederfindung noch die Reproduzierbarkeit des Verfahrens.

### Waschen des Aluminiumoxids nach der Adsorption

Das Waschen des Aluminiumoxids nach der Adsorption kann auf das angegebene Maß beschränkt werden, ohne daß Störungen auftreten.

### Desorption

Zur Ermittlung der für die Desorption am besten geeigneten Säure wurden Essigsäure (Bereich 0,2–1,0 mol/l) und Perchlorsäure (Bereich 0,05–0,2 mol/l) eingesetzt. In Übereinstimmung mit *Mabry* (7) fanden wir 0,05 mol/l Perchlorsäure in bezug auf Wiederfindung und Reproduzierbarkeit als optimal (Tab. 1). Aus dieser Lösung kann zudem die fluorimetrische Bestimmung unmittelbar, d. h. ohne Abtrennung des Aluminiumoxids und Einstellung des pH-Wertes, erfolgen.

Da einerseits die Wiederfindung mit abnehmendem Desorptionsvolumen sinkt, andererseits aber mit größeren Desorptionsvolumina die Fluoreszenzintensitäten bei der Messung durch die Verdünnung kleiner werden, ermittelten wir als Optimum 5 ml der verdünnten Säure (siehe Abb. 1).

### Vorteile der Abtrennungsmethode

1. Von einer Person können 60 Abtrennungen pro Tag ausgeführt werden. Damit verringert sich der Zeit- und

Personalbedarf auf etwa ein Drittel, verglichen mit dem bisherigen Säulenverfahren.

2. Die gesamte Abtrennung findet in einem einzigen Reagenzglas statt. Die Gefahr des Einschleppens von Störsubstanzen ist beträchtlich vermindert.

3. Durch die Teilmechanisierung können die zeitlichen Bedingungen der Abtrennung exakter als im Säulenverfahren eingehalten werden (2).

## Literatur

1. Schwedt, G. (1976), in Tagungsbericht der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin e. V., S. 249–252, Gentner Verlag, Stuttgart.
2. Schwedt, G. (1974), Clin. Chim. Acta 51, 247–256.
3. Schwedt, G. & Bussemas, H. H. (1975), Z. Anal. Chem. 276, 55–59.
4. Wissner, H. (1970), diese Z. 8, 637–648.
5. Merrills, R. J. (1963), Analyt. Biochem. 6, 272–282.
6. Anton, A. H. & Sayre, D. F. (1962), J. Pharmacol. Exper. Therap. (Baltimore) 138, 360–375.
7. Mabry, C. C. & Warth, P. W. (1969), Am. J. Clin. Pathol. 52, 57–68.

H. H. Bussemas  
Institut für Arbeitsphysiologie  
Ardeystraße 67  
D-4600 Dortmund

